

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

SHIBUYA, et al.

Atty. Ref.: 249-323

Serial No. Unassigned

Group: Unassigned

Filed: January 26, 2004

Examiner: Unassigned

For: SUBSTANCE WHICH INHIBITS BINDING OF INFORMATION
TRANSFER MOLECULE FOR 1175-TYROSINE
PHOSPHORYLATED KDR/FLK-1 AND USAGES OF THE
SAME

* * * * *

January 26, 2004

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

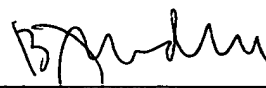
It is respectfully requested that this application be given the benefit of the foreign filing date under the provisions of 35 U.S.C. §119 of the following, a certified copy of which is submitted herewith:

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
2000-303694	Japan	3 October 2000

Respectfully submitted,

NIXON & VANDERHYE P.C.

By: _____



B.J. Sadoff
Reg. No. 36,663

BJS:
1100 North Glebe Road, 8th Floor
Arlington, VA 22201-4714
Telephone: (703) 816-4000
Facsimile: (703) 816-4100

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2000年10月 3日
Date of Application:

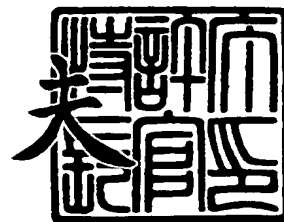
出願番号 特願2000-303694
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2000-303694]

出願人 協和醗酵工業株式会社
Applicant(s): 渋谷 正史

2003年12月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康



【書類名】 特許願

【整理番号】 H12-1781Q3

【提出日】 平成12年10月 3日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 39/00 ADU
C12P 21/08

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県習志野市袖ヶ浦 6 - 5 - 1 0

【氏名】 高橋 知子

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川口市芝 5 3 7 4 - 1 8 - 6 0 1

【氏名】 澁谷 正史

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【特許出願人】

【識別番号】 597173912

【氏名又は名称】 澁谷 正史

【代理人】

【識別番号】 100106574

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩橋 和幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】

要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質の利用方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/Flk-1の情報伝達を阻害する方法。

【請求項 2】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、細胞増殖を阻害する方法。

【請求項 3】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、血管新生を阻害する方法。

【請求項 4】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、細胞増殖阻害剤のスクリーニング法。

【請求項 5】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、血管新生阻害剤のスクリーニング法。

【請求項 6】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/Flk-1の情報伝達を阻害する物質のスクリーニング法。

【請求項 7】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、被験物質がKDR/Flk-1の情報伝達を阻害するかどうかを判定する方法。

【請求項 8】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、組織での血管新生を検出する方法。

【請求項 9】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法。

【請求項 10】 情報伝達分子がPLC- γ である、請求項 1～9のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質が、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的

に認識する抗体である、請求項 1～9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に認識する抗体が、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に結合し、かつPLC- γ のリン酸化を阻害する抗体である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 11 または 12 記載の方法。

【請求項 14】 KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、KDR/Flk-1の情報伝達を阻害する方法。

【請求項 15】 KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、細胞増殖を阻害する方法。

【請求項 16】 KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、血管新生を阻害する方法。

【請求項 17】 KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、被験物質がKDR/Flk-1の情報伝達を阻害するか否かを判定する方法。

【請求項 18】 KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、組織での血管新生を検出する方法。

【請求項 19】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を有効成分として含有する薬剤。

【請求項 20】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を有効成分として含有するKDR/Flk-1のチロシンリン酸化阻害剤。

【請求項 21】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を有効成分として含有する細胞増殖阻害剤。

【請求項 22】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を有効成分として含有する血管新生阻害剤。

【請求項 23】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質が、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に認識する抗体である、請求項 19～22 のいずれかに記載の薬剤。

【請求項 24】 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に認識する

抗体が、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に結合し、かつPLC- γ のリン酸化を阻害する抗体である、請求項23に記載の薬剤。

【請求項25】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項23または24に記載の薬剤。

【請求項26】 KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有するKDR/Flk-1のチロシンリン酸化阻害剤。

【請求項27】 KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有する細胞増殖阻害剤。

【請求項28】 KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有する血管新生阻害剤。

【請求項29】 請求項4～6および9のいずれかに記載の方法により得られる化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質の利用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

VEGFの受容体として、Flt-1(fms-like tyrosine kinase) [Shibuya M et al., Oncogene, 5, 519 (1990)、 de Vries C et al., Science, 255, 989 (1992)] およびKDR(kinase insert domain-containing receptor) [W092/14748、 Terman BI et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 187, 1579 (1992)] が報告されている。KDRはマウスではFlk-1(fetal liver kinase-1)として発見された [W. Matthews et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9026 (1991)、 W094/11499、 Millauer B et al., Cell, 72, 835 (1993)] ので、ここではKDR/Flk-1と総称する。Flt-1およびKDR/Flk-1は両者とも細胞外ドメインは7個のイムノグロブリン様ドメインよりなり、細胞内ドメインにはチロシンキナーゼドメインを有する分子量180～200kDaの受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する膜蛋白で

ある。VEGFはFlt-1およびKDR/Flk-1にはそれぞれ K_D 値が20pmol/lpmおよび75pmol/lで特異的に結合する。Flt-1およびKDR/Flk-1は血管内皮細胞に特異的に発現していると報告されている [Quinn TP et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7533 (1993)、Kendall RL et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8915 (1993)]。

【 0 0 0 3 】

ヒト脳腫瘍組織の腫瘍血管内皮細胞 [Hatva E et al., Am. J. Pathol., 146, 368, (1995)]、ヒト消化器癌組織の腫瘍血管内皮細胞 [Brown LF et al., Cancer Res., 53, 4727 (1993)] において、正常組織の血管内皮細胞に比べKDR/Flk-1のmRNAレベルの発現が上昇していることが報告されている。これらの結果は、腫瘍血管新生においてVEGF-KDR/Flk-1系が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。さらに、慢性関節リウマチ患者の関節の血管内皮細胞においてもイン・サイチュ (in situ) ハイブリダイゼーションによりKDR/Flk-1のmRNAの発現が認められることが報告されており [Fava RA et al., J. Exp. Med., 180, 341, (1994)]、慢性関節リウマチにおけるVEGF-KDR/Flk-1系の重要性を示唆している。

【 0 0 0 4 】

KDR/Flk-1の機能については、ブタ動脈の血管内皮細胞にKDR/Flk-1を発現させるとVEGFに反応し増殖、遊走することから、VEGFの多様な活性の中でKDR/Flk-1は血管内皮細胞の増殖、遊走に関与すると報告されている [Waltenberger J et al., J. Biol. Chem., 269, 26988 (1994)]。また、KDR/Flk-1遺伝子を破壊したノックアウトマウスは血管内皮細胞の増殖や血管の形成が全く認められず、卵黄囊の血島も形成されず、発生後8.5から9.5日の胎児期に死亡したことから、動物個体においてもKDR/Flk-1は血管内皮細胞の増殖、分化に関与することが報告されている [Shalaby F et al., Nature, 376, 62 (1995)]。一方、Flt-1遺伝子のノックアウトマウスも同じ胎児期に死亡するが、その原因は内皮細胞の過剰な増殖と正常な血管の構造が形成できないためであることから [Fong G-H et al., Nature, 376, 66 (1995)]、Flt-1は内皮細胞の増殖を抑制するネガティブな調節因子として血管内皮の正常な構造形成に関与していると考えられ、KDR/Flk-

1とFlt-1はVEGFがその作用を示すうえでそれぞれ別の役割を果たしていると考えられる。

【0005】

VEGFとKDR/Flk-1との結合を阻害できるようなKDR/Flk-1の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体が、インビトロで血管内皮細胞におけるKDR/Flk-1の情報伝達を阻害し増殖を阻害すること [Rockwell P et al., Mol. Cell. Differ., 3, 91 (1995)]、およびこの抗体が、マウスに移植した種々の癌細胞の血管新生や増殖、転移を抑制することが報告されている [Prewett M et al., Cancer Res., 59, 5209 (1999)]。また、KDR/Flk-1のチロシンキナーゼに特異的な阻害剤 SU5416 が、マウスに移植した種々の癌細胞の血管新生や増殖、あるいは転移を抑制することが報告されている [Annie T et al., Cancer Res., 59, 99 (1999)、Shaheen RM et al., Cancer Res., 59, 5412 (1999)]。

【0006】

一般にチロシンキナーゼ型受容体の情報伝達は、リガンドとの結合により自己のチロシンキナーゼが活性化され、自己および他の分子のチロシン残基をリン酸化することで情報伝達が始まると考えられている。この場合、受容体の自己リン酸化チロシンにSH2ドメイン介して別の蛋白質分子が結合し、この分子が他の分子と結合したり酵素反応をおこすことにより情報の伝達が進んでいくと考えられている。KDR/Flk-1の場合も、血管内皮細胞において、VEGFとの結合により自己のチロシン残基がリン酸化を受けることが報告されている [J. Waltenberger et al., J. Biol. Chem., 269, 26988 (1994)]。自己リン酸化されるチロシンの位置としては、これまで、大腸菌で発現させたKDR/Flk-1の中の951、996、1054、1059位のチロシンが自己リン酸化されること [Dougher-Vermazen M et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 205, 728 (1994)]、酵母を用いた系では、PLC- γ が結合するコンセンサス配列に類似した配列中にある801位と1175位のチロシンがリン酸化を受けること [Cunningham SA et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 240, 635 (1997)] が報告されている。また本発明者により、動物細胞で発現させたKDR/Flk-1の主な自己リン酸化部位は1175位、1214位のチロシンであり、801位チロシンはほとんど自己リン酸化を受けないことが報告さ

れている（高橋ら、第5回Vascular Medicine学会 2000年）。また、酵母ツーハイブリッドシステムにより、KDR/Flk-1の1175位のチロシンにアダプター蛋白質SckがそのSH2ドメインを介して結合していることが見出されている [Igarashi K et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 72 (1998)]。

【0007】

KDR/Flk-1の血管内皮細胞の増殖に至る情報伝達では、他のチロシンキナーゼ型受容体と異なりRasやPI3キナーゼの関与はほとんどなく、VEGFの刺激により活性化し自己リン酸化したKDR/Flk-1に、PLC- γ が結合してリン酸化を受けて活性化し、さらにPKCが活性化されその結果MAPキナーゼの活性化とDNA合成の誘導がおこるという、PLC- γ -PKC-MAPキナーゼの系が主に関与していると考えられている [Takahashi T & Shibuya M, Oncogene, 14, 2079 (1997)、Takahashi T et al., Oncogene, 18, 2221 (1999)]。KDR/Flk-1の1175位、1214位のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体を内皮細胞由来の細胞株に発現させることにより、1175位のチロシンのリン酸化がPLC- γ のリン酸化やMAPキナーゼの活性化と関与することが報告されている（高橋ら、第58回日本癌学会総会 1999年）。

【0008】

また、内皮細胞内でVEGF依存的に1175位チロシンがリン酸化されることが報告されている。さらに、リン酸化した1175位チロシンに対する抗体を作製し、この抗体が1175位のチロシンがリン酸化されたKDR/Flk-1を特異的に認識することも報告されている（高橋ら、第5回Vascular Medicine学会 2000年）。しかし、このリン酸化した1175位チロシンに対する抗体と、細胞増殖の阻害との因果関係については知られていない。

【0009】

以上のことから、ヒト型VEGF受容体KDRの情報伝達を阻害できれば、ヒトにおける固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬等の異常な血管新生により病態が進行する疾患の治療に有用であることが期待される。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

KDR/Flk-1の細胞内情報伝達を遮断し、VEGFによる細胞増殖を阻害する物質を取得することが求められている。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、KDR/Flk-1の情報伝達に重要な自己リン酸化部位である、リン酸化した1175位チロシンに対する抗体を作製して、この抗体が1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に検出できるのみならず、この抗体を内皮細胞に注入するとKDR/Flk-1の情報伝達を阻害し、VEGFに依存的な細胞の増殖を抑制できることを見出し、発明を完成させた。

【0012】

すなわち本発明は以下に示す(1)～(29)に関する。

- (1) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/Flk-1の情報伝達を阻害する方法。
- (2) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、細胞増殖を阻害する方法。
- (3) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、血管新生を阻害する方法。
- (4) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、細胞増殖阻害剤のスクリーニング法。
- (5) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、血管新生阻害剤のスクリーニング法。

【0013】

- (6) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/Flk-1の情報伝達を阻害する物質のスクリーニング法。
- (7) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、被験物質がKDR/Flk-1の情報伝達を阻害するか否かを判定する方法。
- (8) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合

を阻害する物質を用いる、組織での血管新生を検出する方法。

(9) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を用いる、KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質のスクリーニング法。

(10) 情報伝達分子がPLC- γ である、上記(1)～(9)のいずれかに記載の方法。

【0014】

(11) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質が、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に認識する抗体である、上記(1)～(9)のいずれかに記載の方法。

(12) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に認識する抗体が、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に結合し、かつPLC- γ のリン酸化を阻害する抗体である、上記(11)記載の方法。

(13) 抗体がモノクローナル抗体である、上記(11)または(12)記載の方法。

(14) KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、KDR/Flk-1の情報伝達を阻害する方法。

(15) KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、細胞増殖を阻害する方法。

【0015】

(16) KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、血管新生を阻害する方法。

(17) KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、被験物質がKDR/Flk-1の情報伝達を阻害するか否かを判定する方法。

(18) KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を用いる、組織での血管新生を検出する方法。

(19) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を有効成分として含有する薬剤。

(20) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結

合を阻害する物質を有効成分として含有するKDR/Flk-1のチロシンリン酸化阻害剤。

【0016】

(21) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を有効成分として含有する細胞増殖阻害剤。

(22) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質を有効成分として含有する血管新生阻害剤。

(23) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質が、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に認識する抗体である、上記(19)～(22)のいずれかに記載の薬剤。

(24) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に認識する抗体が、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に結合し、かつPLC- γ のリン酸化を阻害する抗体である、上記(23)に記載の薬剤。

(25) 抗体がモノクローナル抗体である、上記(23)または(24)に記載の薬剤。

【0017】

(26) KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有するKDR/Flk-1のチロシンリン酸化阻害剤。

(27) KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有する細胞増殖阻害剤。

(28) KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を阻害する物質を有効成分として含有する血管新生阻害剤。

(29) 上記(4)～(6)および(9)のいずれかに記載の方法により得られる化合物。

【0018】

【発明の実施の形態】

KDR/Flk-1の細胞内情報伝達を遮断し、VEGFによる細胞増殖を阻害する物質としては、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質、KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する

物質があげられる。

【0019】

1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質としては、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に認識する抗体または抗体フラグメント、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1と情報伝達分子との結合を阻害する化合物などがあげられる。

本発明で使用される1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に認識する抗体としては、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に認識して結合し、1175位チロシンがリン酸化を受けていないKDR/Flk-1とは結合しない特異性を有する抗体（以下、「1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体」と表記する）であれば、いずれでも用いられるが、好ましくはリン酸化されたKDR/Flk-1とPLC- γ との結合を阻害する抗体があげられる。

【0020】

抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体などがあげられるが、好ましくはモノクローナル抗体があげられる。

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産された抗体および、抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体をあげることができる。

【0021】

遺伝子組換え抗体としては、ヒト化抗体、ならびに一本鎖抗体およびジスルフィド安定化抗体などの抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものが好ましく用いられる。

本発明に使用するヒト化抗体は、ヒト型キメラ抗体およびヒト型CDR移植抗体を包含する。

【0022】

本発明で使用される抗体断片は、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に特異的に反応する抗体断片であるFab(Fragment of antigen bindingの略)、Fab'、F(ab')₂、一本鎖抗体(single chain Fv; 以下、scFvと称す) およびジスルフィド

イド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、dsFvと称す)を包含する。

また、抗体断片には、上記抗体の抗体可変領域(V領域とも称す)重鎖(H鎖とも称す)(以下、抗体可変領域重鎖をVHとも称す)および抗体V領域軽鎖(L鎖とも称す)(以下、抗体可変領域軽鎖をVLとも称す)の相補性決定領域(complementary determining region; 以下、CDRと称す)のアミノ酸配列から選ばれるペプチドも包含する。

【0023】

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体可変領域重鎖および可変領域軽鎖とヒト抗体の定常領域重鎖(以下、CHと称す)およびヒト抗体の定常領域軽鎖(以下、CLと称す)とからなる抗体を意味する。

本発明で使用されるヒト型キメラ抗体は、1175位チロシンリン酸化特異的抗KDRモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

【0024】

本発明に使用するヒト型キメラ抗体の構造としては、いずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいが、IgG型、さらにはIgG型に属するIgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のイムノグロブリンのC領域が好ましい。

ヒト型CDR移植抗体は、ヒト抗体のVHおよびVLのCDRをヒト以外の動物の抗体のCDR配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。

【0025】

本発明で使用されるヒト型CDR移植抗体は、1175位チロシンがリン酸化したKDR/F1k-1に特異的に反応する、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDR配列で任意のヒト抗体のVHおよびVLのCDR配列をそれぞれ置換したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびヒト抗体のCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

【0026】

本発明で使用されるヒト型CDR移植抗体C領域の構造としては、いずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいが、IgG型、さらにIgG型に属するIgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のイムノグロブリンのC領域が好ましい。

Fabは、IgGのヒンジ領域で2本のH鎖を架橋している2つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パパイニンで分解して得られた、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体で構成された、分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

【0027】

本発明で使用されるFabは、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に特異的に反応する抗体をパパイニン処理して得ることができる。または、該抗体のFab断片をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fabを製造することができる。

Fab'は、上記F(ab')₂のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

【0028】

本発明で使用されるFab'は、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に特異的に反応する抗体を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体のFab'断片をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することができる。

【0029】

F(ab')₂は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明で使用されるF(ab')₂は、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に特異的に反応する抗体をトリプシン処理して得ることができる。または、該抗体のF(ab')₂断片をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、F(ab')₂を製造することができる。

【0030】

一本鎖抗体 (scFv) は、一本のVHと一本のVLとを適当なペプチドリンカー (以下、Pと称す) を用いて連結した、VH-P-VLないしはVL-P-VHポリペプチドを示す。本発明で使用するscFvに含まれるVHおよびVLは、本発明のモノクローナル抗体あるいはヒト型CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

本発明で使用する一本鎖抗体は、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に特異的に反応する抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、一本鎖抗体発現ベクターを構築したのち該cDNAを挿入し、大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ該発現ベクターを導入することにより発現させ製造することができる。

【0031】

ジスルフィド安定化抗体 (dsFv) は、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法 [Protein Engineering, 7, 697 (1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のジスルフィド安定化抗体に含まれるVHあるいはVLはモノクローナル抗体あるいはヒト型CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

【0032】

本発明で使用するジスルフィド安定化抗体は、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に特異的に反応する抗体を生産するハイブリドーマよりVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、該cDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ導入し発現させることにより製造することができる。

【0033】

1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1と情報伝達分子との結合を阻害する化合物としては、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対するアンチセンスRNAあるいはDNA、情報伝達分子に対する抗体または該抗体フラグメント、情報伝達分子に対するアンチセンスRNAまたはDNA、または後述するスクリーニング方法あるいはドラッグデザイン方法により得られた化合物などがあげられる。情報

伝達分子としては、例えばPLC- γ があげられる。

【0034】

また、本発明で使用されるKDR/Flk-1の1175位のチロシンのリン酸化を阻害する物質としては、KDR/Flk-1の1175位のチロシンのリン酸化を阻害する抗体あるいは該抗体フラグメント、KDR/Flk-1の1175位のチロシンのリン酸化を阻害する作用を有するキナーゼ阻害剤、または後述するスクリーニング方法あるいはドラッグデザイン方法により得られた化合物などがあげられる。

【0035】

以下に、KDR/Flk-1の1175位のチロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質、KDR/Flk-1の1175位のチロシンのリン酸化を阻害する物質およびそれらの物質を含む医薬の用途について説明する。

【0036】

1. 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質およびKDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質の取得方法

1-1 1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体の製造法

(1) 抗原とするペプチドの調製

1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体は、KDR/Flk-1のアミノ酸配列のうちの、1175位のチロシンを含む連続した5～20残基のアミノ酸配列からなり、1175位チロシンに相当するアミノ酸がリン酸化チロシンになっているペプチドを化学合成し、このペプチドを抗原として動物を免疫することにより作製することができる。必要によってはペプチドのN末端またはC末端には、後述する担体蛋白質との結合に用いるためのシステイン残基を付加した配列にする。このような抗原のペプチドとして、KDR/Flk-1のアミノ酸配列の1171～1180番めの配列のN末端にシステインを付加した配列を有し、1175位のチロシン残基に相当する4番目のアミノ酸がリン酸化チロシンである配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドをあげることができる。チロシンがリン酸化されたペプチドは、文献の方法 [Kitas EA et al., *Helv. Chim. Acta*, 74, 1314 (1991)、Bannworth W and Kitas EA, *Helv. Chem. Acta*, 75, 707 (1992)、Kitas EA et al., *Tetrahedr*

on Lett., 30, 6229 (1989)、Kitas EA et al., Tetrahedron Lett., 29, 3591 (1988)] に基づきペプチド合成機等を用いて固相合成を行うことにより化学合成することができる。

【0037】

(2) 1175位チロシンリン酸化特異的抗KDRポリクローナル抗体の調製

上記のペプチドに対するポリクローナル抗体を含む抗血清は、文献 [Harlow E and Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press. (1988)] 等に記載の一般的な方法により、マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバントとともに抗原を10日から4週間おきに数回投与して免疫を行うことにより調製することができる。抗原は(1)で調製したペプチドだけでは抗原として抗体を惹起する力が弱いので、ペプチドをキーホール・リンペット・ヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanine, KLH)、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、破傷風毒素などの担体蛋白質に結合させたものを抗原とし、例えばウサギでは200~1000 μ g、マウスで10~100 μ gを1回あたり投与する。ペプチドと担体蛋白質との結合はm-マレイニイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミド (MBS)、グルタルアルデヒドを用いて行うことができる。アジュバンドとしては、フロインドの完全アジュバント (Complete Freund's Adjuvant) または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどがあげられる。各投与後3~10日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、抗原に用いたリン酸化ペプチドに対する反応性について、酵素免疫測定法で確認し、その血清が十分な抗体価を示した動物から採取した血清を抗血清とする。酵素免疫測定法は、抗原に用いたリン酸化ペプチドをプレートにコートし、サンプルである血清を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射性同位体等で標識した抗イムノグロブリン抗体 (免疫に用いた動物のイムノグロブリンに対する抗体) を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、抗原ペプチドを認識し結合する抗体を検出および定量する方法である [酵素免疫測定法 (ELISA法): 医学書院刊 (1976年)]。

【0038】

(1) で調製した抗原用のペプチドを、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド (N-hydroxysuccinimide、NHS) により活性化したセファロースー 4 B [アマシャム・ファルマシア・バイオテック (Amersham Pharmacia Biotech) 社] やその充填済カラムであるハイトラップ NHS-活性化カラム (HiTrap NHS-activated column、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社) 等に固定化して作製したアフィニティークラムを用いて、上記の抗血清に対してアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、容易に抗原ペプチドと結合するポリクローナル抗体を精製することができる。ペプチドの固定化やアフィニティークロマトグラフィーはメーカーのマニュアルに従って行うことができる。

【0039】

このようにして精製したポリクローナル抗体中には、抗原としたペプチドの配列中のリン酸化チロシン以外の部分をエピトープとするために、抗原としたペプチドあるいは1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1と結合するばかりでなく、1175位チロシンがリン酸化されていないKDR/Flk-1とも結合できるような抗体も含まれている。そこで、(1) で調製した抗原用のペプチドと同じアミノ酸配列において、リン酸化チロシンが (リン酸化されていない) チロシンになっているペプチドをペプチド合成機などで化学合成し、このペプチドを上記と同様に固定化したアフィニティークラムに、上記で精製したポリクローナル抗体を通すことにより、1175位チロシンがリン酸化を受けていないKDR/Flk-1も認識する抗体 (このような抗体は、アフィニティークラム上の非リン酸化チロシンペプチドとも結合する) をカラムに結合させて除き、1175位チロシンリン酸化特異的抗KDRポリクローナル抗体を精製することができる。

【0040】

(3) モノクローナル抗体の調製

(2) と同様にして3~20週令のマウスまたはラットを免疫し、血清中に十分な抗体価を示した動物の脾臓、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。例えば脾臓を摘出し、脾細胞を採取する。

【0041】

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン

耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Kohler G et al., *Europ. J. Immunol.*, 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14(SP-2) [Shulman et al., *Nature*, 276, 269 (1978)]、P3-X63Ag8653(653) [Kearney JF et al., *J. Immunol.*, 123, 1548 (1979)]、P3-X63Ag8(X63) [Kohler G et al., *Nature*, 256, 495 (1975)] など、イン・ビトロ (in vitro) で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法 [Harlow E and Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. (1988)] に従い、細胞融合時までに 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

【 0 0 4 2 】

抗体産生細胞と骨髓腫細胞と最小培地 (minimal essential medium、MEM) あるいはPBS (phosphate buffered saline) で洗浄したのち、ポリエチレングリコール-1000などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させる。融合細胞をHAT培地 [正常培地 (RPMI-1640培地に 1.5mmol/l グルタミン、 $5 \times 10^{-5}\text{mol/l}$ β -メルカプトエタノール、 $10\mu\text{g/ml}$ ジェンタマイシンおよび10%ウシ胎児血清 (FCS) を加えた培地) に 10^{-4}mol/l ヒポキサンチン、 $1.5 \times 10^{-5}\text{mol/l}$ チミジンおよび $4 \times 10^{-7}\text{mol/l}$ アミノプテリンを加えた培地] に懸濁させ、96穴プレートに分注して培養する。

【 0 0 4 3 】

培養後、各穴の培養上清の一部をとり酵素免疫測定法により、(2)の抗原のペプチドと同一の配列の非リン酸化ペプチドとは反応せずに、抗原としたリン酸化ペプチドと特異的に反応するものを選択する。選択した穴内の細胞から、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し [1回目は、HT培地 (HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものを1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【 0 0 4 4 】

プリスタン (Pristane、2、6、10、14-テトラメチルペンタデカン) 0.5ml を腹腔内投与し、2週間飼育した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに

、上記で得られた1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体産生ハイブリドーマ細胞 $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該マウスまたはヌードマウスから腹水を採取し、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAEセファロースカラム、プロテインAカラムあるいはセルロファインGSL2000（生化学工業）のカラムなどを用いて、IgGあるいはIgM画分を回収し、精製モノクローナル抗体とする。

【0045】

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、モノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行うことができる。蛋白質量は、ローリー法あるいは波長280nmでの吸光度より算出することができる。

【0046】

1-2 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質およびKDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質をスクリーニングする方法

上記1-1で得られた抗体とKDR/Flk-1を発現する細胞を用いて、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質または1175位のチロシンリン酸化を阻害する物質をスクリーニングすることができる。

【0047】

本発明のスクリーニング方法としては、免疫学的測定法を利用したスクリーニング方法があげられる。免疫学的測定法としては、任意の公知の免疫学的測定方法があげられる。免疫学的測定法としては、例えば、競合法、サンドイッチ法[免疫学イラストレイテッド 第5版（南光堂）]があげられるが、サンドイッチ法が好ましい。

サンドイッチ法を利用したスクリーニング方法とは、具体的には、固相に第一の抗体を結合させた後、被験物質と、VEGF含有培地で培養したKDR/Flk-1発現細胞とを反応させた後、標識した第二の抗体を反応させる方法である。

【0048】

サンドイッチ法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、上述したFab、Fab'、F(ab)₂などの抗体断片を用いてもよい。サンドイッチ法で用いる2種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体あるいは抗体フラグメントの組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体あるいは抗体フラグメントの組み合わせでもよい。例えば、KDR/Flk-1の細胞外領域を認識する抗体またはその抗体断片と、前記1で製造された1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体またはその抗体断片との組み合わせがあげられる。固相に結合させる抗体および標識する抗体は、2つの抗体のいずれでもよい。

標識方法としては、放射性同位元素、酵素、蛍光、発光などがあげられるが、好ましくは酵素での標識があげられる。

以下にスクリーニング方法を具体的に説明する。

【0049】

96穴プレートに1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体を分注し、4℃で一晩放置して吸着させる。洗浄後、1%牛血清アルブミンを含むPBSを加えて、室温で1時間静置して非特異的吸着をブロックする。PBSで洗浄後、VEGFを含まない培地で培養したKDR/Flk-1を発現する細胞の細胞抽出液を分注した後に、VEGFおよび試験物質を添加してKDR/Flk-1を活性化し反応させる。洗浄後にウェルに結合したKDR/Flk-1の量を、1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体とは別のエピトープを認識する抗体例えばKDR/Flk-1の細胞外領域を認識する抗KDR/Flk-1抗体を用いて酵素免疫測定法により測定する。試験物質を添加しない場合のKDR/Flk-1の結合量と試験物質を添加した場合の結合量を測定し比較することにより、1175位のチロシンリン酸化を阻害する物質、あるいは、1175位のチロシンリン酸とPLC- γ などのアダプター分子の結合を阻害する物質をスクリーニングすることができる。

【0050】

1-3 ドラッグデザインによる1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質およびKDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質の取得方法

本発明の1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質は、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1の細胞内領域と情報伝達分子との構造を、X線結晶解析またはNMR解析で得られた数値をもとに計算機上のシミュレーションによりKDR/Flk-1の細胞内領域と情報伝達分子との結合領域を推定し、かつそれらの分子間結合を阻害することが可能な化合物を既存のデータベースあるいはコンピューターソフトを用いた構築により、取得することができる。

【0051】

また、KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質は、1175位がリン酸化される際のチロシンキナーゼの構造を、X線結晶解析またはNMR解析で得られた数値をもとに計算機上のシミュレーションにより推定し、新規化合物を既存のデータベースから選択するか、あるいはコンピューターソフトを用いた構築により、取得する。

上記で取得した化合物は、前記1-2のスクリーニング方法で示したアッセイ方法を用いることにより、阻害活性を有しているか否かを確認することができる。

【0052】

2. 1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体によるKDR/Flk-1の情報伝達の阻害および細胞増殖の阻害

本発明で使用される1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質またはKDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質が、KDR/Flk-1の情報伝達を阻害すること、細胞増殖あるいは血管新生を阻害することは、以下の方法で確認することができる。

【0053】

(1) PLC- γ とKDR/Flk-1の結合の阻害

KDR/Flk-1発現細胞、例えばNIH3T3-KDR [Sawano A et al., Cell Growth Differ., 7, 213 (1996)] をVEGFで刺激してKDR/Flk-1を活性化した後に細胞抽出液を調製する。ここにPLC- γ あるいはPLC- γ のSH2ドメイン、例えばGST (グルタチオンSトランスフェラーゼ) とPLC- γ C末端側SH2ドメイン融合蛋白質 [サンタ・

クルズ・バイオテクノロジー社 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)] を添加し結合させる。この系に該抗体を添加した場合と添加しない場合について、PLC- γ あるいは PLC- γ の SH2 ドメインを免疫沈降やグルタチオン固定化ビーズ等により分離した後に、抗 KDR/F1k-1 抗体を用いたイムノブロットを行い、免疫沈降物中の KDR/F1k-1 の量を比較する。該抗体を添加した場合に、非添加時と比較して免疫沈降物中の KDR/F1k-1 の量が減少していれば、インビトロで該抗体が KDR/F1k-1 と PLC- γ の結合を阻害しているといえる。

【0054】

また、KDR/F1k-1 を発現している血管内皮細胞例えば、洞様血管内皮細胞やヒト臍帯静脈血管内皮細胞の中に該抗体をマイクロインジェクションにより注入した細胞と注入しない細胞について、VEGF により刺激した後に細胞抽出液を調製する。それぞれの細胞抽出液について上記と同様に抗 PLC- γ 抗体により PLC- γ を免疫沈降した後に、免疫沈降物について抗 KDR/F1k-1 抗体を用いたイムノブロットを行い、免疫沈降物中の KDR/F1k-1 の量を比較する。該抗体を注入した場合に、非注入時と比較して免疫沈降物中の KDR/F1k-1 の量が減少していれば、インビボで該抗体が KDR/F1k-1 と PLC- γ の結合を阻害しているといえる。免疫沈降やイムノブロットは Harlow E and Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press. (1988) 等の実験書に記載の方法で行うことができる。

【0055】

(2) PLC- γ リン酸化の阻害

(1) と同様にして該抗体を細胞内に注入した血管内皮細胞と注入しない細胞から VEGF 刺激後に調製した細胞抽出液について、抗 PLC- γ 抗体により PLC- γ を免疫沈降した後に、免疫沈降物について抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロットを行い、免疫沈降物中のリン酸化した PLC- γ の量を比較する。該抗体を注入した場合に、非注入時と比較して免疫沈降物中のリン酸化した PLC- γ の量が減少していれば、インビボで該抗体が PLC- γ のリン酸化すなわち PLC- γ の活性化を阻害しているといえる。

【0056】

(3) MAPキナーゼ活性化の阻害

(1)と同様にして該抗体を細胞内に注入した血管内皮細胞と注入しない細胞からVEGF刺激後に調製した細胞抽出液について、リン酸化MAPキナーゼに特異的な抗体を用いたイムノブロットを行い、リン酸化したMAPキナーゼの量を比較する。該抗体を注入した場合に、非注入時と比較して細胞内のリン酸化したMAPキナーゼの量が減少していれば、インビボで該抗体がMAPキナーゼのリン酸化すなわちMAPキナーゼの活性化を阻害しているといえる。

【0057】

(4) 細胞増殖の阻害

(1)と同様にして該抗体を細胞内に注入した血管内皮細胞と注入しない細胞について、VEGFで刺激する際にブロモデオキシウリジン (BrdU) を添加し、VEGF刺激により新たに合成されたDNAを標識する。細胞を免疫組織染色用に固定化し、抗BrdU抗体で染色することにより、新たにDNAが合成された細胞を検出する。該抗体を注入した場合に、非注入時と比較して染色された細胞数が減少していれば、インビボで該抗体がDNAの合成すなわち細胞増殖のシグナルを阻害しているといえる。あるいは、BrdUのかわりに [^3H] チミジンを添加して培養して新たに合成されたDNAを標識した後、細胞をグラスフィルター等で回収して細胞の放射能を測定することにより、DNA合成量を測定する。該抗体を注入した場合に、非注入時と比較して放射能が減少していれば、インビボで該抗体がDNAの合成すなわち細胞増殖のシグナルを阻害しているといえる。

【0058】

3. 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質およびKDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質の用途

本発明で使用される1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質、KDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質は、KDR/Flk-1の情報伝達分子の結合を阻害し、細胞増殖を阻害する活性または血管新生を阻害する活性を有している。これらの性質を有する物質は、以下の用途に使用することができる。

【0059】

(1) 本発明で使用される1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質およびKDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質の使用方法

前記2より、本発明で使用する1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体は、KDR/Flk-1の情報伝達分子の結合を阻害し、細胞増殖または血管新生などを阻害するために用いることができる。

【0060】

固形腫瘍の増殖など細胞増殖に関わる疾患、または転移形成、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症などの血管新生に関わる疾患の診断または治療に用いることができる。

また、血管内皮細胞などの細胞内における細胞増殖の情報伝達には、KDR/Flk-1が重要であるため、1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体は、KDR/Flk-1を介した血管内皮の増殖を阻害するために用いることができる。従って、ヒト型VEGF受容体KDRの情報伝達を阻害できれば、ヒトにおける固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬等の異常な血管新生により病態が進行する疾患の診断または治療に用いることができる。

【0061】

(2) 1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質またはKDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質を有効成分として含有する薬剤

これまでに、このような阻害剤としては、1) 細胞外ドメインに対する中和抗体、可溶性KDR/Flk-1などの、KDR/Flk-1とVEGFとの結合を阻害する物質、2) キナーゼ阻害剤など細胞内のキナーゼを阻害することにより以降の情報伝達を阻害する物質が知られている。これらの物質に対し、前記2で確認される性質を有する、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質またはKDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質は、新規なメカニズムのVEGF-KDR/Flk-1の情報伝達の阻害剤、すなわち細胞増殖阻害剤および血管新生阻害剤として使用することができる。

【0062】

1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1に対する情報伝達分子の結合を阻害する物質またはKDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化を特異的に阻害する物質を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

【0063】

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

【0064】

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

【0065】

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

【0066】

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該化合物または抗体そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物または抗体を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。

【0067】

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物または抗体および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

本医薬組成物の投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、ヒトを含む哺乳動物に対し、各化合物または抗体として0.1~20mg/kg/日投与する。投与は、各化合物または抗体を同時に投与する場合は、1日1回（単回投与または連日投与）または間歇的に1週間に1~3回、2、3週間に1回、別々に投与する場合は、各々の化合物または抗体を、適宜時間をおいて、1日1回（単回投与または連日投与）または間歇的に1週間に1~3回、2、3週間に1回静脈注射により行う。

【0068】

（3）血管新生の早期検出

前記1-1で製造された本発明で使用する抗体が、リン酸化されたKDR/Flk-1、すなわち情報伝達を行っているKDR/Flk-1のみを検出できることを利用して、臨床組織材料について、該抗体を用いた免疫組織染色を行うことができる。染色された部位は、KDR/Flk-1が活性化していることを示すため、染色部位を観察することにより新生血管を検出するよりも早い時期に、血管新生の初期の段階またはこれから血管新生がおこる部位を検出することができる。免疫組織染色は、Harlow E and Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press. (1988)等の実験書に記載する方法で行うことができる。

【0069】

(4) VEGF-KDR/Flk-1の系での情報伝達を阻害するか否かの判定方法

被験物質が実際に、動物個体においてVEGF-KDR/Flk-1の系の情報伝達の阻害効果があるかどうかを判定するには、非ヒト動物、例えばマウスに腫瘍を移植し、被験物質を投与した場合と非投与の場合で、移植した腫瘍の成長や腫瘍周辺の血管新生を観察し、比較する方法が用いられてきたため、効果を判定するまでに数週間を要した。

【0070】

本発明は、本発明で用いる抗体が、情報伝達を行っているKDR/Flk-1のみを検出できることを利用し、以下の方法で短期間に被験物質がVEGFの阻害効果を有するか否かを判定することができる。

被験物質を投与したマウスおよび未投与マウス（コントロール）について、被験物質を投与した1～2日後にそれぞれ血管内皮を採取し、1175位チロシンリン酸化特異的抗KDR抗体による免疫組織染色を行う。該抗体による染色量は、リン酸化したKDR/Flk-1の量を示す。したがって、被験物質を投与したマウス血管内皮の染色量が未投与マウス血管内皮の染色量と比較して減少していれば、動物個体においてVEGF-KDR/Flk-1の系の情報伝達が阻害されていると判定することができる。

以下に実施例を示す。

【0071】

【実施例】

実施例1 1175位チロシンのリン酸化を検出できる抗体

(1) KDR/Flk-1の1175位のチロシンのリン酸化を特異的に検出できる抗体の作製

配列番号1に示す配列（ヒトKDR/Flk-1のアミノ酸配列の1171～1180番めの配列のN末端にシステインを付加した配列で、1175位に相当するチロシンがリン酸化されている配列）のペプチドPY1175を化学合成した。このペプチドPY1175をシステインを利用してKLHとのコンジュゲートにしたものを抗原として、ウサギを免疫することにより抗血清を得た。ハイトラップNHS活性化カラム（HiTrap NHS-activated column、アマシャム・ファルマシア・バイオテク社）にペプチドPY11

75を固定化し、PY1175アフィニティーカラムを作製し、得られた抗血清を通すことによりPY1175と結合する抗体を精製した。さらに、配列番号2で表されるアミノ酸配列（PY1175と同じアミノ酸配列だが、チロシンがリン酸化されていない配列）を有するペプチドY1175を化学合成し、ハイトラップNHS活性化カラムに固定化してY1175アフィニティーカラムを作製し、上記のPY1175アフィニティーカラムにより精製した抗体を通すことにより、リン酸化チロシン以外の部分をエピトープとする抗体をY1175アフィニティーカラムに結合させて除き、KDR/Flk-1の1175位のリン酸化チロシンに特異的な抗体（以下抗PY1175抗体とする）だけを精製した。なお、マウスKDR/Flk-1（GenBankアクセス番号X59397）にはPY1175の2～10番めと同じ配列（Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro）が1169～1179番めに存在するので、上記のようにして調製した抗PY1175抗体は、ヒトKDR/Flk-1だけでなくリン酸化したマウスKDR/Flk-1も認識できると考えられる。

【0072】

（2）抗PY1175抗体の特異性

マウスの内皮細胞系の細胞株であるMSS31細胞 [Yanai N et al., Cell Struct. Funct., 16, 87 (1991)] は、上記文献の培養条件で培養した。この細胞に天然型KDR/Flk-1、1175位のチロシンをフェニルアラニンに置換したY1175F、1214位のチロシンをフェニルアラニンに置換したY1214F、801位のチロシンをフェニルアラニンに置換したY801Fの各変異型KDR/Flk-1発現アデノウイルスベクター（参考例1参照）を37℃で1時間感染させた。それぞれの細胞を感染後2日間培養した後、培地を0.1%FCSを含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）に交換して12時間培養し、10ng/ml VEGF [文献 (Cohen T et al., Growth Fact., 7, 131 (1992)) の記載に従って、VEGF発現昆虫細胞Sf-9の培養上清からヘパリンカラムクロマトグラフィーにより精製した組換えヒトVEGF] を添加して37℃で5分間培養した。この細胞と、コントロールのVEGFを添加しなかった細胞について、細胞溶解用緩衝液 [50mmol/l HEPES(pH7.4)、150mmol/l NaCl、10%グリセロール、1%トリトンX-100、5mmol/l EDTA、2%アプロチニン、1mmol/l PMSF、50mmol/l NaF、10mmol/l ピロリン酸ナトリウム、2mmol/l バナジン酸ナトリウム] を用いて細胞抽出液を調製した。それぞれの細胞抽出液について抗PY1175抗体を用いて

イムノブロットを行った。以降のイムノブロットは、文献 [Takahashi T & Shibuya M, Oncogene, 14, 2079 (1997)] の方法で行った。また、同時に抗KDR/Flk-1抗体 [化学合成した配列番号 6 に示す配列のペプチド (ヒトKDR/Flk-1のアミノ酸配列の947~966番目に相当する) を抗原として、ウサギを免疫して作製したポリクローナルな抗血清] および抗リン酸化チロシン抗体 [ICNバイオケミカルズ (ICN Biochemicals) 社] を用いたイムノブロットを行い、KDR/Flk-1 (リン酸化の有無にかかわらず)、自己リン酸化したKDR/Flk-1を含むリン酸化蛋白質をそれぞれ検出した。その結果を図 1 A に示したが、1175位がフェニルアラニンのためリン酸化できないY1175FはVEGF添加細胞でも検出されないのに対し、Y1175F以外の各KDR/Flk-1は、VEGFを添加した細胞のみに抗PY1175抗体でバンドが検出され、内皮細胞の細胞内でもVEGFに依存して1175位チロシンがリン酸化を受けることが見出された。なお、抗PY1175抗体では、VEGFを添加した細胞でのみバンドが検出できたことから、抗PY1175抗体はKDR/Flk-1の1175位チロシンの自己リン酸化を特異的に検出できることが確認された。

【0073】

また、他のチロシンキナーゼ型受容体であるbFGF受容体、PDGF受容体、VEGF受容体Flt-1、PDGF受容体、EGF受容体を発現している細胞として、KDR/Flk-1を恒常的に発現させたNIH3T3細胞であるNIH3T3-KDR [天然型KDR/Flk-1の他に内在性のbFGF受容体およびPDGF受容体を発現、Sawano A et al., Cell Growth Differ., 7, 213 (1996)]、Flt-1を恒常的に発現させたNIH3T3細胞であるNIH3T3-Flt-1 [Sawano A et al., Cell Growth Differ., 7, 213 (1996)]、HeLa細胞 (内在性EGF受容体を発現、ATCC番号CCL-2) を培養した。培養は、NIH3T3-KDRおよびNIH3T3-Flt-1は、10%FCS、2mmol/l L-グルタミン、40 μ g/mlカナマイシン、200 μ g/ml G418を添加したDMEMで、HeLa細胞は10%FCS、2mmol/l L-グルタミン、40 μ g/mlカナマイシンを添加したDMEMを用いて行った。培地の血清濃度を0.1%に低下させて6~7時間培養後、それぞれのリガンドであるVEGF、ヒトbFGF [オンコジーン・サイエンス社 (Oncogene Science Inc.)]、PDGF B/B [ロシュ (Roche) 社]、EGF (東洋紡社) で刺激した細胞と刺激しない細胞の各細胞抽出液について、抗PY1175抗体および抗KDR/Flk-1抗体、抗リン酸化チロシン抗体を用い

たイムノブロットを行った。その結果を図1Bに示したが、抗リン酸化チロシン抗体では、全てのチロシンキナーゼ受容体のリガンド依存的な自己リン酸化が検出されたのに対し、抗PY1175抗体ではNIH3T3-KDRをVEGFで刺激した場合にのみバンドが検出された。したがって、全てのリン酸化受容体を検出できる抗リン酸化チロシン抗体と異なり、抗PY1175抗体は、1175位のチロシンがリン酸化されたKDR/Flk-1を特異的に認識することが確認された。

【0074】

実施例2 抗PY1175抗体を用いたイムノブロットによる内在性自己リン酸化KDR/Flk-1の検出

内在性KDR/Flk-1を発現しているヒト臍帯静脈内皮細胞（森永）を5% FCSおよび各種増殖因子を添加した完全培地（日水製薬）またはヒューメディア-EG2培地（HuMedia-EG2、倉敷紡績）で培養した。また、同様に内在性KDR/Flk-1を発現しているラット洞様血管内皮細胞をラット肝臓から文献[Yamane A et al., Oncogene 9, 2683 (1994)]に記載の方法で単離し、10ng/ml VEGFを含むヒューメディア-EG2培地で培養した。これらの細胞について、培地を0.1%FCSを含むDMEMに交換して6～7時間培養後、VEGF、bFGF、HGF[R&D・システムズ社(R & D Systems Inc.)]を添加して刺激した。VEGF等で刺激した細胞とコントロールの刺激しなかった細胞について細胞抽出液を調製し、抗PY1175抗体、抗KDR/Flk-1抗体、抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロットを行った。その結果を図1Cに示したが、抗PY1175抗体ではヒト臍帯静脈血管内皮細胞およびラット洞様血管内皮細胞の両者とも、VEGFで刺激した場合にのみ、230kDaの1175位チロシンリン酸化KDR/Flk-1のバンドが検出された。したがって、血管内皮細胞の内在性のKDR/Flk-1についても、VEGF依存的に1175位チロシンが自己リン酸化を受けることが確認された。

【0075】

実施例3 抗PY1175抗体を用いた免疫組織染色による自己リン酸化KDR/Flk-1の検出

ヒト臍帯静脈内皮細胞を培養し、培地を0.1%FCSを含むDMEMに交換して6～7時間培養後、10ng/ml VEGFあるいは50ng/ml bFGFで刺激した。コントロールの刺激

をしなかった細胞、VEGF刺激後5分後の細胞、VEGF刺激後30分後の細胞、bFGF刺激後5分後の細胞をそれぞれアセトン／メタノールで2分間処理することにより固定した。固定した細胞を1%ヤギ血清を含むPBSで30分間ブロッキングした後、抗PY1175抗体を用いて免疫組織染色を行った。検出は1/100に希釈したFITC標識抗ウサギIgG抗体〔カッペル (Cappel) 社〕で30分間処理後、蛍光顕微鏡観察により行った。その結果、VEGFで刺激後5分後の細胞でのみ細胞膜および細胞質にKDR/Flk-1の1175位チロシンのリン酸化が検出されたが、VEGF刺激後30分後の細胞ではもはや1175位チロシンのリン酸化は検出されなかった。したがってVEGFの刺激によりすぐに1175位チロシンのリン酸化がおこるが、このリン酸化は一過的なものであることがわかった。刺激をしなかった細胞、bFGFで刺激をした細胞では染色はみられず、この1175位チロシンのリン酸化はVEGF刺激特異的であった。またVEGFで刺激後5分後の細胞の免疫組織染色時に1 μ g/mlのペプチドPY1175を共存させた場合は、染色が阻害された。このように抗PY1175抗体はイムノブロットだけでなく、免疫組織染色によるKDR/Flk-1の1175位チロシンリン酸化の検出にも有用であった。

【0076】

実施例4 抗PY1175抗体によるPLC- γ とKDR/Flk-1の結合の阻害

(1) 細胞内でのKDR/Flk-1とPLC- γ の結合

実施例1(2)と同様にしてアデノウイルスベクターを用いてMSS31細胞に天然型KDR/Flk-1またはY1175Fを発現させ、10ng/ml VEGFで刺激した。この細胞およびコントロールのVEGF刺激をしなかった細胞の細胞抽出液を調製し、抗KDR/Flk-1抗体を用いて免疫沈降を文献〔Takahashi T & Shibuya M, Oncogene, 14, 2079 (1997)〕に記載の方法で行った。免疫沈降物について抗PLC- γ 抗体〔アップステート・バイオテクノロジー社 (Upstate Biotechnology Inc.)〕を用いたイムノブロットを行った。その結果を図2に示したが、天然型KDR/Flk-1発現細胞では、VEGFで刺激した場合にのみ免疫沈降物からPLC- γ が検出され、VEGFの刺激によりKDR/Flk-1にPLC- γ が結合することが確認された。一方、Y1175F発現細胞では、VEGF刺激した場合でもPLC- γ は検出されず、Y1175FにはPLC- γ は結合しないことがわかった。したがって、1175位チロシンのリン酸化がPLC- γ の結合に必

須であることがわかった。

【0077】

(2) インビトロでのKDR/F1k-1とPLC- γ のSH2ドメインとの結合

実施例1(2)と同様にして、10ng/mlのVEGFで刺激したNIH3T3-KDRとコントロールのVEGFで刺激しなかった細胞から細胞抽出液を調製した。1.5 μ gのGST、GSTとPLC- γ のSH2ドメイン(2個)の融合蛋白質(GST-PLC- γ SH2-SH2)、GSTとPLC- γ のN末端側のSH2ドメインの融合蛋白質(GST-PLC- γ N-SH2)、GSTとPLC- γ のC末端側のSH2ドメインの融合蛋白質(GST-PLC- γ C-SH2)[以上全てサンタ・クルズ・バイオテクノロジー社(Santa Cruz Biotechnology Inc.)]を、それぞれグルタチオンセファロース4B・ビーズ(アマシャム・ファルマシア・バイオテック社)に固定化し、細胞抽出液に添加して、4℃で2時間反応させた。ビーズを冷却した細胞抽出用緩衝液で3回洗浄後、SDSサンプルバッファー中で加熱することにより、ビーズに結合した蛋白質を溶解させ、SDS-PAGEを行った。抗KDR/F1k-1抗体を用いたイムノブロットによりそれぞれの添加した蛋白質に結合したKDR/F1k-1を検出した。その結果を図3に示したが、GST-PLC- γ SH2-SH2およびGST-PLC- γ C-SH2では、VEGFで刺激した細胞でKDR/F1k-1が検出されたのに対し、GST-PLC- γ N-SH2ではKDR/F1k-1が検出されなかった。したがって、PLC- γ の2つのSH2ドメインのうちC末端側のSH2ドメインが自己リン酸化したKDR/F1k-1と結合していることがわかった。

【0078】

上記と同じ実験をGST、GST-PLC- γ C-SH2、GSTとGrb2のSH2ドメインの融合蛋白質(GST-Grb2 SH2)、GSTとPI3キナーゼのN末端側のSH2ドメインの融合蛋白質(GST-PI3K N-SH2)(以上全てサンタ・クルズバイオテクノロジー社)を用いて行ったところ、図4に示すようにGST-PLC- γ C-SH2のみ、VEGFで刺激した細胞でKDR/F1k-1が検出され、GST-Grb2 SH2、GST-PI3K N-SH2ではKDR/F1k-1は検出されなかった。したがって自己リン酸化したKDR/F1k-1はPLC- γ のSH2ドメインとは結合するが、Grb2やPI3キナーゼのSH2ドメインとは結合しないことが確認された。

【0079】

(3) 抗PY1175抗体によるKDR/F1k-1とPLC- γ の結合の阻害

(2)と同様の実験をGST-PLC- γ C-SH2を固定化したビーズと細胞抽出液の反応時に抗PY1175抗体、PY1175ペプチドを共存させて行った。その結果、VEGF刺激した細胞でもKDR/F1k-1が検出されず抗PY1175抗体、PY1175ペプチドにより自己リン酸化したKDR/F1k-1とPLC- γ の結合が阻害された。一方、コントロールのウサギIgGあるいはY1175ペプチドを共存させた場合は、阻害はみられなかった(図5 A、B)。したがって、PLC- γ のC末端側のSH2ドメインがKDR/F1k-1の自己リン酸化した1175位のチロシンと直接結合していることが強く示唆された。

【0080】

実施例5 抗PY1175抗体による細胞増殖シグナルの抑制

まず初代培養したラット洞様血管内皮細胞をコラーゲンでコートしたスライドグラス上にのせ、チミジンを除いたDMEMにヒューメディア-EG2調製用増殖添加剤(倉敷紡績)およびVEGFを添加した培地で2日間培養後、VEGF非添加の同じ培地で6~7時間培養した。細胞に50ng/ml VEGFを添加して刺激すると同時に、100 μ mol/l 5-ブロモデオキシウリジン(BrdU、シグマ・アルドリッチ社)を添加して20時間培養し、新たに合成されたDNAに取り込ませた。コントロールとしてVEGFを添加しなかった細胞についても同様の処理を行った。次いでそれぞれの細胞を3.7%のホルムアルデヒドを含むPBSで固定化し、メタノールで10分間、2mol/l塩酸で10分間処理することにより、細胞の透過性を上げた。この細胞を1%のヤギ血清を含むPBSで1/200希釈した抗BrdU抗体(宝酒造社)と60分間反応させ免疫組織染色を行うことにより、BrdUが取り込まれた細胞を検出した。その結果図6に示すように、VEGFで刺激しなかった細胞ではBrdUの取り込みがほとんど観察されなかったのに対し、VEGFを添加した場合には、BrdUが取り込まれた細胞が多数観察され、ラット洞様血管内皮細胞における細胞増殖のシグナルはVEGFの刺激に非常に依存していることが確認された。

【0081】

そこで同様にスライドグラス上で培養したラット洞様血管内皮細胞について、VEGF非添加の培地で6~7時間培養した後にVEGFで刺激する前にこの細胞の細胞質に自動マイクロインジェクター5246[エッペンドルフ(Eppendorf)社]およ

びマイクロマニピレーター5171（エッペンドルフ社）を用いて抗PY1175抗体あるいはコントロールのウサギIgGを注入した。注入の1～3時間後に細胞に上記と同様に50ng/ml VEGFおよび100 μ mol/l BrdUを添加して20時間培養し、新たに合成されたDNAに取り込ませた。上記と同様にして細胞を固定化およびメタノールおよび塩酸で処理し、1/200希釈抗BrdU抗体（宝酒造社）と60分間反応させた後、1/200希釈したFITC標識抗マウスIgG（抗BrdU抗体と反応、カッペル社）および1/100希釈したRITC標識抗ウサギIgG（抗PY1175抗体、ウサギIgGと反応、カッペル社）の混合物と30分間反応させ免疫組織染色を行うことにより、BrdUが取り込まれた細胞および抗体（抗PY1175またはウサギIgG）が注入された細胞を検出した。その結果図6に示すようにウサギIgGを注入した細胞では、VEGFの刺激により半数以上の細胞にBrdUが取り込まれ、VEGFの刺激により細胞の増殖シグナルが伝わりDNAの合成が行われたことが示された。一方、抗PY1175抗体を注入した細胞では1/4程度の細胞にしかBrdUが取り込まれておらず、VEGF刺激による細胞の増殖のシグナルが阻害されたことが示された。

【0082】

参考例1 変異型KDR/Flk-1発現アデノウイルスベクターの作製

変異型のKDR/Flk-1であるY1175F（1175位のチロシンをフェニルアラニンに置換）、Y1214F（1214位のチロシンをフェニルアラニンに置換）、Y801F（801位のチロシンをフェニルアラニンに置換）を発現するアデノウイルスベクターを以下のように作製した。

【0083】

Y1175FをコードするDNAは配列番号3で表される塩基配列を有するプライマーを用いて、天然型のKDR/Flk-1 cDNA [Sawano A et al., Cell Growth Differ., 7, 213 (1996)] を鋳型にしてPCRを行うことにより変異を導入した断片を、KDR/Flk-1 cDNAのApaI/PstIサイト間に挿入することにより作製した。Y1214FをコードするDNAは配列番号4で表される塩基配列のプライマーを用いて同様にPCRを行うことにより変異を導入した断片を、KDR/Flk-1 cDNAのApaI/PstIサイト間に挿入することにより作製した。また、Y801FをコードするDNAは配列番号5で表される塩基配列を有するプライマーを用いて同様にPCRを行うことにより変異を導入し

た断片を、KDR/Flk-1 cDNAのSphI/BamHIサイトに挿入することにより作製した。これらの変異型KDR/Flk-1をコードするDNAは、塩基配列を決定して変異が導入されていることを確認した。これらの変異型KDR/Flk-1をコードするDNAについてアデノウイルス発現ベクターキット（宝酒造社）を用いることにより、それぞれのKDR/Flk-1発現アデノウイルスベクター（組換えアデノウイルス）を作製した。

【 0 0 8 4 】

【発明の効果】

1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に認識する抗体は、1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1を特異的に検出できるのみならず、該抗体を内皮細胞に注入するとKDR/Flk-1の情報伝達を阻害し、VEGFに依存的な細胞の増殖を抑制することができる。

【 0 0 8 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> usages of antibodies recognizing 1175-tyrosine phosphorylated KDR/
Flk-1

<130>

<140>

<141>

<160> 6

<170> Patent In Ver. 2.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> PHOSPHORYLATION

<222> 6

<220>

<223> an antigen peptide for human KDR/FIk-1 phosphorylated at
1175-tyrosine corresponding to its residue 1171-1180
and added cysteine residue at the N-terminal.

<400> 1

Cys Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a peptide consisting of the same sequence as SEQ ID
No:10 without phosphorylation.

<400> 2

Cys Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a primer for replacing of human KDR/Flk-1 tyrosine residue
at position 1175 to phenylalanine.

<400> 3

gatggcaaag acttcattgt tcttccc

27

【 0 0 8 6 】

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a primer for replacing of human KDR/Flk-1 tyrosine residue
at position 1214 to phenylalanine.

<400> 4

cccaaattcc atttcgacaa cacagca

27

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a primer for replacing of human KDR/Flk-1 tyrosine residue
at position 801 to phenylalanine.

<400> 5

gacaggcttc ttgtccatcg

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は抗PY1175抗体を用いたイムノブロットによる、種々の細胞内の1175位チロシンがリン酸化したKDR/Flk-1の検出を示す図である。

図 1 A は左から天然型KDR/Flk-1 (Wt)、Y1175F、Y1214F、Y801Fの各変異型KDR/Flk-1を発現させた細胞株MSS31の細胞抽出液のイムノブロットを示す。各レーンの-はVEGFで刺激しなかった細胞、+はVEGFで刺激した細胞の結果である。図 1 B は左からNIH3T3-KDR、NIH3T3-Flt-1、HeLaの各細胞の細胞抽出液のイムノブロットを示す。-は刺激しなかった細胞、VEGF、bFGF、PDGF、EGFはそれぞれで刺激した細胞の結果である。図 1 C は左からヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)

およびラット洞様血管内皮細胞 (ratSEC) の細胞抽出液のイムノブロットを示す。－は刺激しなかった細胞、VEGF、bFGF、HGFはそれぞれで刺激した細胞の結果である。図 1 A～Cともに上段は抗PY1175抗体を用いたイムノブロット、中段は抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロット、下段は抗KDR/Flk-1抗体を用いたイムノブロットの結果を示す。矢印は上段および中段は自己リン酸化したKDR/Flk-1 (pKDR/Flk-1) のバンドの位置を示し、下段はKDR/Flk-1 (自己リン酸化しているもの、していないもの両者を含む) のバンドの位置を示す。

【図 2】 図 2 はKDR/Flk-1を発現させたMSS31細胞におけるインビボでのKDR/Flk-1とPLC- γ の結合を示す図である。Wtは天然型KDR/Flk-1、Y1175FはY1175F変異型KDR/Flk-1を発現させた細胞、－はVEGFで刺激しなかった細胞、＋はVEGFで刺激した細胞それぞれの抗KDR/Flk-1抗体による免疫沈降物について、上段は抗PLC- γ 抗体、下段は抗KDR/Flk-1抗体を用いたイムノブロットの結果を示す。矢印は上段はPLC- γ 、下段はKDR/Flk-1のバンドの位置を示す。TCLは、MSS31細胞の細胞抽出液 (免疫沈降なし) の抗PLC- γ 抗体によるイムノブロットの結果を示す。

【図 3】 図 3 はPLC- γ のSH2ドメインとKDR/Flk-1のインビトロでの結合を示す図である。GSTあるいはGSTと種々の蛋白質のSH2ドメインの融合蛋白質とNIH3T3-KDRの細胞抽出液を反応させ、グルタチオンアフィニティーカラムにより単離したGSTあるいはGSTと各SH2ドメインの融合蛋白質について、上段は抗KDR/Flk-1抗体、下段は抗GST抗体を用いたイムノブロットの結果を示す。－はVEGFで刺激しなかった細胞、＋はVEGFで刺激した細胞の細胞抽出液を用いた場合である。左からGST、GST-PLC- γ SH2-SH2、GST-PLC- γ N-SH2、GST-PLC- γ C-SH2を用いた場合である。矢印は上段はKDR/Flk-1、下段はGSTあるいはGSTと各SH2ドメインの融合蛋白質のバンドの位置を示す。TCLは、NIH3T3-KDRの細胞抽出液のみ (アフィニティーカラムなし) のイムノブロットの結果を示す。

【図 4】 図 4 はPLC- γ のSH2ドメインとKDR/Flk-1のインビトロでの結合を示す図である。GSTあるいはGSTと種々の蛋白質のSH2ドメインの融合蛋白質とNIH3T3-KDRの細胞抽出液を反応させ、グルタチオンアフィニティーカラムにより単離したGSTあるいはGSTと各SH2ドメインの融合蛋白質について、上段は抗KDR/Flk-1抗体、下段は抗GST抗体を用いたイムノブロットの結果を示す。－はVEGFで刺激

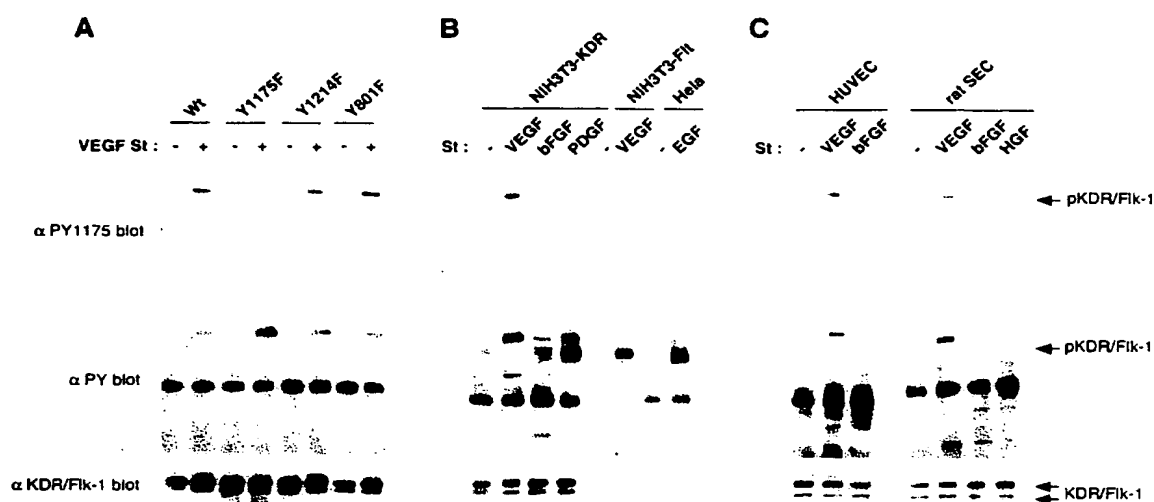
しなかった細胞、+はVEGFで刺激した細胞の細胞抽出液を用いた場合である。左からGST、GST-PLC- γ C-SH2、GST-Grb2 SH2、GST-PI3K N-SH2を用いた場合である。矢印は上段はKDR/F1k-1、下段はGSTあるいはGSTと各SH2ドメインの融合蛋白質のバンドの位置を示す。TCLは、NIH3T3-KDRの細胞抽出液のみ（アフィニティーカラムなし）のイムノプロットの結果を示す。

【図5】 図5は抗PY1175抗体およびPY1175ペプチドによるPLC- γ のSH2ドメインとKDR/F1k-1のインビトロでの結合の阻害を示す図である。GST-PLC- γ C-SH2とNIH3T3-KDRの細胞抽出液および抗体／ペプチドを添加して反応させた後にGST-PLC- γ C-SH2を単離したものについての、上段は抗KDR/F1k-1抗体、下段は抗GST抗体を用いたイムノプロットの結果を示す。-はVEGFで刺激しなかった細胞、+はVEGFで刺激した細胞の細胞抽出液を用いた場合である。図5Aは左から、添加なし、ウサギIgG、抗PY1175抗体を添加した場合、図5Bは左から、添加なし、PY1175ペプチド、Y1175ペプチドを添加した場合の結果である。矢印は上段はKDR/F1k-1、下段はGST-PLC- γ C-SH2のバンドの位置を示す。TCLは、NIH3T3-KDRの細胞抽出液のみ（アフィニティーカラムなし）のイムノプロットの結果を示す。

【図6】 図6は抗PY1175抗体を注入したラット洞様血管内皮細胞におけるVEGFによる細胞増殖シグナルの阻害を示す図である。左から抗体の注入なし（VEGF刺激なし）、抗体の注入なし（VEGF刺激）、ウサギIgG注入（VEGF刺激）、抗PY1175抗体注入（VEGF刺激）の場合の、BrdUを取り込んだ細胞の割合（%）を示すグラフである。

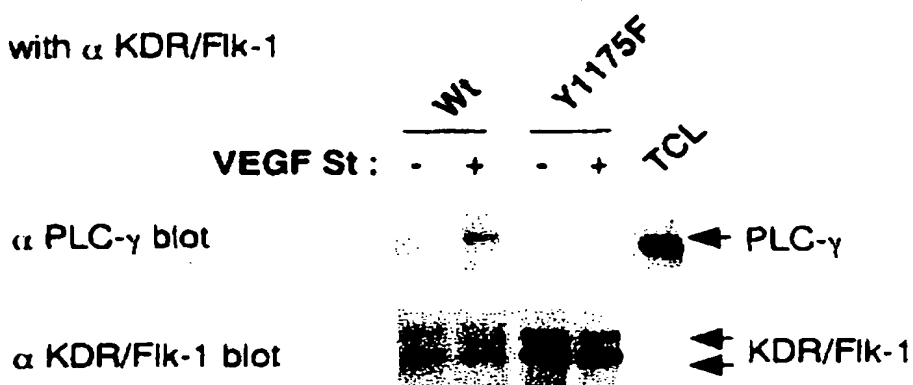
【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】

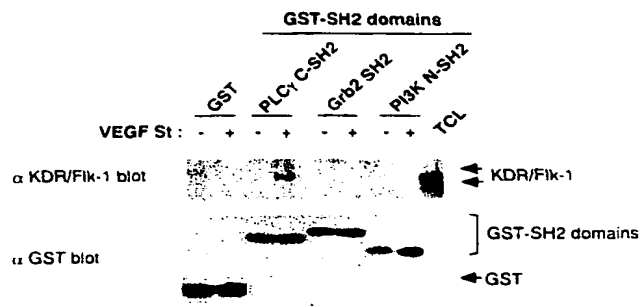
IP with α KDR/Fik-1



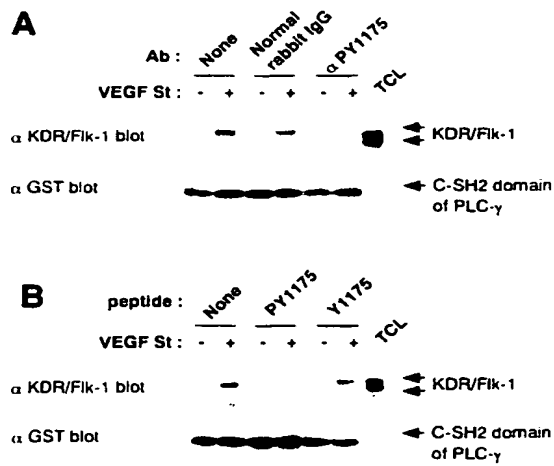
【図 3】



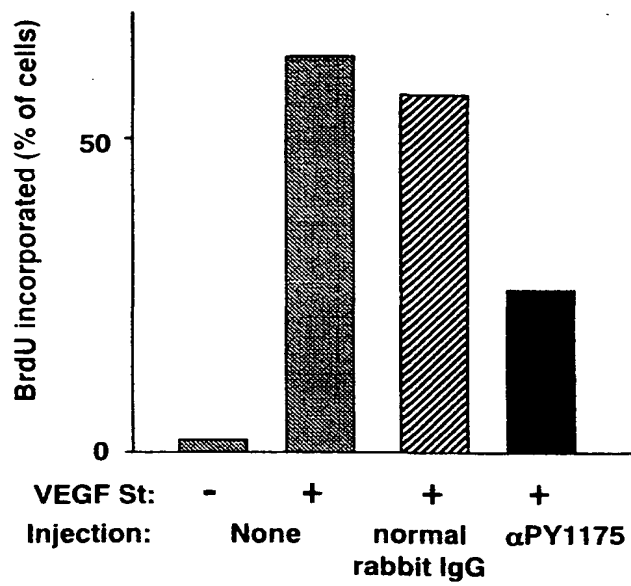
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 KDR／Flk-1の細胞内情報伝達を遮断し、VEGFによる血管内皮細胞の増殖を阻害する物質を取得することが求められている。

【解決手段】 1175位チロシンがリン酸化したKDR／Flk-1に特異的に反応する抗体を有効成分として含有するKDR/Flk-1のチロシンリン酸化阻害剤、細胞増殖阻害剤および血管新生阻害剤を提供する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2000-303694
受付番号	50001281389
書類名	特許願
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成 12 年 10 月 5 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000001029
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号
【氏名又は名称】	協和醗酵工業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】	597173912
【住所又は居所】	埼玉県川口市芝 5 3 7 4 - 1 8 - 6 0 1
【氏名又は名称】	渋谷 正史

【代理人】

申請人	
【識別番号】	100106574
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号 協和醗酵 工業株式会社 知的財産部
【氏名又は名称】	岩橋 和幸

次頁無

特願 2 0 0 0 - 3 0 3 6 9 4

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 0 2 9]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号

氏 名

協和醗酵工業株式会社

特願 2 0 0 0 - 3 0 3 6 9 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 7 1 7 3 9 1 2]

1. 変更年月日
[変更理由]

1 9 9 7 年 1 2 月 1 2 日
新規登録

住 所
氏 名

埼玉県川口市芝 5 3 7 4 - 1 8 - 6 0 1
渋谷 正史